

学校编码: 10384

学号: 21720081152523

分类号__密级__

UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

闽南地区五个品种茶树病斑周围可培养真菌
的多样性和抗茶叶真菌病害的活性筛选

Diversity of culturable fungi associated with foliar lesions of
five varieties of *Camellia sinensis* in South Fujian and
the activity screening against fungal pathogens of tea leaves

李慧

指导教师姓名: 徐 洵 研究员
汤熙翔 副研究员

专 业 名 称: 水 生 生 物 学

论文提交日期: 2011 年 04 月

论文答辩时间: 2011 年 06 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: 郑天凌

评 阅 人:

2011 年 06 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

目录

摘 要	I
ABSTRACT	II
1 前言	1
1.1 茶与茶树简介	1
1.2 茶树真菌多样性研究概况	2
1.2.1 植物内生真菌研究	2
1.2.2 茶树相关真菌研究	4
1.2.3 分子生物学和系统进化方法在真菌多样性研究中的应用	4
1.3 茶叶真菌病害研究进展	5
1.3.1 茶树的主要病害	5
1.3.2 茶叶真菌病害	6
1.4 真菌来源的活性物质研究概况	7
1.4.1 生物防治和生物活性物质	7
1.4.2 深海真菌来源的活性物质	8
1.4.3 植物内生真菌来源的活性物质	9
1.5 本课题研究的目的和意义	11
2 材料与方法	12
2.1 材料	12
2.1.1 肿瘤细胞株	12
2.1.2 真菌菌株	12
2.1.3 PCR 引物	13
2.1.4 常用溶液的配制	14
2.1.5 常用培养基	14
2.1.6 主要试剂及耗材	15
2.1.7 主要仪器	16

2.2 方法	16
2.2.1 样品采集	17
2.2.2 真菌分离和纯化	17
2.2.3 真菌分子鉴定及 PKS 扩增	18
2.2.4 系统进化和种群多样性分析	20
2.2.5 茶叶真菌潜在新种的细胞毒活性筛选	21
2.2.6 致病性验证	22
2.2.7 拟盘多毛孢属真菌形态学观察	22
2.2.8 茶叶内生真菌和深海真菌抗茶叶真菌病害的活性筛选	23
2.2.9 化合物分离	23
3 结果与分析	25
3.1 茶叶真菌分子鉴定和多样性分析	25
3.2 茶叶真菌的系统进化分析	33
3.3 茶叶真菌潜在新种的 ITS 和 LSU 序列鉴定及其细胞毒活性	36
3.3.1 茶叶真菌潜在新种的 ITS、LSU 测序结果	36
3.3.2 茶叶真菌潜在新种的细胞毒活性	37
3.3.3 茶叶真菌潜在新种活性的分子筛选结果	38
3.4 茶叶致病真菌	39
3.4.1 茶叶主要的真菌病害种类	39
3.4.2 茶叶主要致病真菌对不同品种茶叶的致病情况	41
3.5 拟盘多毛孢属真菌形态学观察和致病性比较	43
3.5.1 拟盘多毛孢属真菌菌落生长速度	44
3.5.2 拟盘多毛孢属真菌孢子形态	45
3.5.3 拟盘多毛孢属真菌孢子中间三色孢颜色同异	46
3.5.4 拟盘多毛孢属真菌致病性比较	47
3.6 从茶叶内生真菌和深海真菌中筛选抗茶叶真菌病害的活性菌株	47
3.7 从 LH40 分离鉴定的部分化合物及其细胞毒活性	49
3.7.1 分离的化合物及其质量	49
3.7.2 化合物细胞毒活性检测	51

3.7.3 化合物 40-8-5 的鉴定结果.....	52
4 讨论.....	54
5 小结和展望.....	57
参考文献.....	58
附录.....	68
致谢.....	74

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
1 Introduction	1
1.1 Brief introduction of tea and tea plants	1
1.2 The research overview of fungi diversity in tea plants	2
1.2.1 The research progress of plant endophytic fungi	2
1.2.2 The research of fungi associated with tea plants	4
1.2.3 Application of molecular and phylogenetic analysis in fungi diversity research	4
1.3 The summary of tea plants diseases	5
1.3.1 The main disorder of tea plants.....	5
1.3.2 Fungous diseases of tea leaves.....	6
1.4 The general introduction of bioactive compounds from fungi	7
1.4.1 Biological control and bioactive compounds	7
1.4.2 Active compounds from deepsea fungi	8
1.4.3 Active compounds from plant endophytes.....	9
1.5 Aims and significances of this research	11
2 Materials and methods	12
2.1 Materials	12
2.1.1 Tumor cells.....	12
2.1.2 Fungal strains	12
2.1.3 PCR primers	13
2.1.4 The prepare of solution.....	14
2.1.5 Medium	14
2.1.6 Agent and consumptive material.....	15

2.1.7 Instruments	16
2.2 Methods	16
2.2.1 Sampling	17
2.2.2 Fungi isolation	17
2.2.3 Molecular identification of fungi and PKS amplification	18
2.2.4 Phylogenetic and diversity analysis	20
2.2.5 The cytotoxic activity screening of potentially novel species	21
2.2.6 Pathogenic fungi confirmation of tea leaves	22
2.2.7 Morphology observation of <i>pestalotiopsis</i> spp.	22
2.2.8 The activity screening of fungi extracts against fungal pathogens	23
2.2.9 Compounds isolation	23
3 Results and analysis	25
3.1 Molecular identification results and fungal diversity	25
3.2 The phylogenetic analysis of fungi	33
3.3 The molecular identification results of potentially novel species and their activity	36
3.3.1 The molecular identification results of potentially novel species	36
3.3.2 The cytotoxic activity of potentially novel species	37
3.3.3 The PKS amplification of potentially novel species	38
3.4 Pathogenic fungi of tea leaves	39
3.4.1 Kinds of pathogenic fungi of tea leaves	39
3.4.2 Comparison of fungi pathogenicity to different varieties of tea plants	41
3.5 Morphology and pathogenicity of <i>pestalotiopsis</i> spp.	43
3.5.1 Colony growth velocity of <i>pestalotiopsis</i> spp.	44
3.5.2 Spore morphous of <i>pestalotiopsis</i> spp.	45
3.5.3 The color of the midest three cells of <i>pestalotiopsis</i> spp. spores	46
3.5.4 The pathogenicity of <i>pestalotiopsis</i> spp.	47
3.6 The activity screening results of fungi from deepsea and endophytes from tea leaves against fungal pathogens	47

3.7 Compounds from isolate LH40 and their cytotoxic activity	49
3.7.1 Compounds isolated from LH40 and their quantity	49
3.7.2 Cytotoxic activity of the compounds	51
3.7.3 The identification results of compound 40-8-5	52
4 Discussion	54
5 Summary	57
References	58
Appendix	68
Acknowledgement	74

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

茶是世界上最重要三大饮料之一，它是由茶树的嫩叶制作而得的，福建以乌龙茶而出名。茶树在生长中受到各种病害的侵染，其中叶片的真菌病害的危害最严重，造成的损失最大。针对茶叶的生物农药在生产中有着广泛的应用前景。深海真菌是一个重要的资源库，其中含有很多未被认知和利用的资源；植物内生真菌是医学、农业和工业中新型天然活性物质的重要来源，从深海真菌和茶叶内生真菌中筛选抗茶叶真菌病害的活性物质，为生产和社会服务，有着重要的意义。本研究从茶园采取茶树病叶样品，从病斑周围分离真菌，对真菌类群的多样性进行研究，验证茶叶的致病真菌，对深海真菌和茶叶内生真菌抑制茶叶致病菌的活性进行筛选，为茶叶生物农药的研制奠定基础。

本研究从福建厦门无公害茶园采取了本山、丹桂、黄旦、毛蟹、铁观音 5 个茶树品种的 112 个病叶样品，共从中分离出 307 株真菌。用 ITS rDNA (Internal Transcribed Spacer of ribosomal DNA) 序列分析的方法对所有真菌进行了鉴定，并建立了系统进化树。结果显示 90.9% 的真菌是子囊菌，分属于子囊菌的 12 个目；其余 9.1% 的真菌分属于担子菌的 5 个目。经致病性验证实验分析，子囊菌中的某些类群，如 *Pestalotiopsis theae*, *Pestalotiopsis* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* (有性型 *Glomerella cingulata*), *Alternaria* sp., *Phoma* sp., *Neofusicoccum* sp. 是茶树叶片的致病真菌。对分得的拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis*) 真菌中的 36 株进行了形态学、ITS 序列和致病性方面的比较和鉴定。从茶树 5 个品种中分离到的真菌的种类和数目差异很大，这种差异显示真菌多样性和宿主密切相关。值得一提的，有 19 个种系型的 ITS 序列同源性在 98% 及以下，这些可能是潜在的新菌类群，用部分大亚基 (large subunit, LSU) 序列鉴定的方法进一步明确了这些真菌的分类地位。以潜在真菌新种的 DNA 为模板，有 2 株用 PKS 引物扩增出了相应的 PKS 序列；用 CCK8 法检测出 4 株茶叶真菌潜在新种具有明显的细胞毒活性；从茶叶内生真菌和深海真菌中共筛选出抗茶叶致病真菌的活性菌 18 株，并选取具有细胞毒活性和抑制致病真菌活性的茶叶真菌潜在新种 LH40 菌株进行了化合物的初步分离，获得主代谢产物弯孢霉毒素。

关键词：*Camellia sinensis*；ITS rDNA 序列鉴定；真菌多样性；致病菌；潜在新种；活性物质

厦门大学博硕士论文摘要库

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库